

## تفکیک سویه های کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با استفاده از پلی مورفیسم قطعه طولی محدود بر اساس ژن *hsp65*

دکتر آذر دخت خسروی\*، عبدالرزاق هاشمی\*\*

\*استادیار گروه میکروبیولوژی پزشکی و مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری اهواز- دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز (مؤلف مسئول)،  
\*\*کارشناسی ارشد میکروبیولوژی پزشکی - دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز.

تاریخ دریافت: ۸۳/۱۱/۱۵ - تاریخ تأیید: ۸۴/۷/۱۴

### چکیده:

زمینه و هدف: در سال های اخیر، به کارگیری تکنیک PCR (Polymerase Chain Reaction) و به دنبال آن آنالیز محصول PCR توسط آنزیم های محدودالایتر (Restriction Fragment Length Polymorphism=RFLP) برای افتراق مایکوباکتریوم ها تا سطح گونه، استفاده شده است. در حالی که جزئیات افتراقی گونه های غیرتوبرکلوزی مایکوباکتریوم ها توسط این تکنیک مشخص شده و حتی در تعدادی از آنها این روش برای پیگیری مولکولار اپیدمیولوژی اثبات شده است، تنها تعداد کمی از سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مورد بررسی قرار گرفته اند. مطالعه حاضر این متد افتراقی را برای سویه های جدا شده در مقیاس وسیع تر با هدف تعیین پلی مورفیسم احتمالی مورد ارزیابی قرار داد.

روش بررسی: یکصد و پنجاه سویه کلینیکی از بیماران مراجعه کننده به مرکز سل اهواز جمع آوری شد. رنگ آمیزی اسیدفست برای سویه ها انجام گرفت، سپس سویه ها به عنوان مایکوباکتریوم توبرکلوزیس توسط خصوصیات کشت و تست های بیوشیمیایی دسته بندی شدند. تکنیک PCR-RFLP با استفاده از DNA ژنومی استخراج شده به دنبال PCR بر مبنای تکثیر قطعه ۴۳۹bp از ژن *hsp65* توسط پرایمرهای اختصاصی جنس مورد استفاده قرار گرفت. بعد از هضم محصولات PCR توسط آنزیم های *HaeIII* و *BstEII* آنالیز آنزیمی انجام گرفت. یافته ها: بر اساس نتایج بدست آمده، ۱۴۵ سویه کلینیکی (۹۶/۶٪) الگوهای یکسان شبیه به سویه های استاندارد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، برای *HaeIII* فراگمنت هایی به طول ۱۶۵/۱۴۰/۷۲ و برای *BstEII* به طول ۲۵۰/۱۲۰/۸۲، نشان دادند. سه الگوی متفاوت در پنج سویه کلینیکی در الگوهای بدست آمده از هضم *HaeIII* با فراگمنت هایی به طول ۱۶۵/۱۴۵ (سه سویه)، ۱۸۰/۱۰۰/۸۰ (یک سویه) و ۱۹۴/۷۲ (یک سویه) مشاهده شد در حالی که الگوی بدست آمده از هضم *BstEII* این سویه ها تنوع نداشت و شبیه به دیگر سویه ها بود. نتیجه گیری: نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان داد که در موارد نادر، پلی مورفیسم هایی در توالی ژن *hsp65* سویه های کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ممکن است وجود داشته باشد.

واژه های کلیدی: آنزیم های محدود الاثر، تشخیص مولکولی، ژن *hsp65*، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس.

### مقدمه:

به طور کلی تفریق گونه ها و تعیین هویت	خصوصیات ظاهری کلنی، سرعت رشد و تست های
سریع مایکوباکتریوم ها یکی از مشکلات اساسی در راه	بیوشیمیایی استوار است (۱). با توجه به نیاز به امکانات
تشخیص، کنترل و درمان بیماری های حاصل از خانواده	ویژه، تست های بیوشیمیایی برای افتراق گونه ها در همه
مایکوباکتریومی است. این امر به صورت سنتی بر اساس	آزمایشگاه های مایکوباکتریولوژی کشور به صورت



معمول انجام نمی‌شود. تکنیک‌های متفاوتی از قبیل تکنیک کروماتوگرافی با کیفیت عالی (HPLC)، کروماتوگرافی گاز مایع (GLC)، کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) برای این منظور به کار رفته‌اند (۲، ۱). این تکنیک‌ها یا به دلیل هزینه‌های بالا و یا قابل اعتماد نبودن نتایج در بعضی از موارد، استفاده معمول از آنها برای تعیین هویت و جداسازی گونه‌های مایکوباکتریومی رایج نشده است. هیبریدیزاسیون پروب بر پایه RNA یا DNA علی‌رغم سریع و کارآمد بودن، به دلیل عدم توانایی در تفکیک انواعی از گونه‌ها نیز کاربرد روتین پیدا نکرده است (۳). متدهای جدید بر اساس PCR یکی از مهمترین و کاربردی‌ترین، در عین حال ساده‌ترین روش‌های مولکولار برای تعیین هویت مایکوباکتریوم‌ها هستند. وجود پلی‌مورفیسم در نواحی خاصی از چندین ژن با توالی محافظت شده جنس مایکوباکتریومی مانند ژن کدکننده پروتئین ۳۲ کیلودالتونی (۴) ژن *dnaJ* (۵)، ژن *sod* (۶)، ژن *rpoB* (۷)، ژن *hsp65* (۸) و ژن *rrs* (16SrDNA) (۸)، امکان تعیین هویت سریع و آسان‌تر گونه‌های مایکوباکتریومی را از همدیگر فراهم آورده است. از کاربردی‌ترین توالی‌های فوق برای این مقصود، استفاده از وجود پلی‌مورفیسم در توالی ژن‌های *hsp65* و *rrs* است (۱). پروتئین شوک حرارتی ۶۵ کیلو دالتونی یکی از مهمترین آنتی‌ژن‌هایی است که در همه گونه‌های مایکوباکتریومی وجود دارد. ژن مسؤل آن، *hsp65*، به صورت کامل، تعیین توالی شده است (۹). در سال ۱۹۹۳ محققى به نام Telenti و همکارانش یک متد سریع مولکولی برای تعیین هویت و افتراق مایکوباکتریوم‌ها تا سطح گونه معرفی نمودند. در

مطالعه وی، قطعه ژنی به طول ۴۳۹bp در موقعیت ۸۳۶-۳۹۸ از توالی *hsp65* توسط دو پرایمر مخصوص جنس توسط PCR تکثیر گردید و محصول PCR توسط دو آنزیم محدودالایتر (*BstEII*, *HaeIII*) مورد تجزیه قرار گرفت. با بررسی الگوهای بدست آمده از هضم محصول PCR، گونه‌های مورد مطالعه مایکوباکتریومی از همدیگر تفکیک گردیدند (۸). تکنیک هضم آنزیمی (RFLP) بر اساس توالی ۴۳۹bp از ژن *hsp65* مایکوباکتریومی در تعیین هویت مایکوباکتریوم‌ها بسیار کارآمد است. با این وجود در بعضی از گونه‌های مایکوباکتریومی از جمله در مایکوباکتریوم فلاوسنس (*M.flavescens*) و گوردونه (*M.gordonae*) (۸)، مایکوباکتریوم اسکروفولاسئوم (*M.scrofulaceum*) (۱۰)، مایکوباکتریوم فورجوتیوم (*M.fortuitum*)، مایکوباکتریوم اسمگماتیس (*M.smegmatis*)، مایکوباکتریوم کانزاسی (*M.kansasii*) و مایکوباکتریوم آویوم (*M.avium*) (۱۱)، بر اساس تایپینگ با این تکنیک، بیش از چند نوع الگوی هضم آنزیمی مشاهده شده است که بیانگر حضور زیر گونه‌هایی در این مایکوباکتریوم‌ها است. در مطالعه اولیه (۸) و نیز در مطالعات بعدی در مناطق مختلف (۱۴-۱۲)، اشاره شده است که کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و پاتوژن مهم آن (مایکوباکتریوم توبرکلوزیس) دارای پلی‌مورفیسم در توالی فوق از ژن *hsp65* نمی‌باشند و از لحاظ انگشت‌نگاری یکسان می‌باشند. با توجه به اینکه در مطالعات انجام شده قبلی تنها گونه‌های استاندارد و یا تعداد معدودی از سویه‌های کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مورد بررسی قرار گرفته بودند، لذا در این مطالعه تعداد قابل توجهی از سویه‌های کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با هدف

تعیین پلی مورفیسم احتمالی با استفاده از روش بررسی گردید.

## روش بررسی:

در یک مطالعه توصیفی تعداد ۱۵۰ سویه کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از بهمن ماه ۱۳۸۲ تا آذرماه ۱۳۸۳ از انواع نمونه های کلینیکی کشت داده شده در مرکز رفرانس سل و جذام اهواز جداسازی و تعیین هویت شدند. دو سویه استاندارد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس H37Rv (انستیتو پاستور ایران) و BKH37 (مؤسسه رازی کرج) و یک سویه استاندارد مایکوباکتریوم بوویس BCG سویه 1173-p2 (انستیتو پاستور ایران) به عنوان کنترل برای انجام تست های بیوشیمیایی و کارهای مولکولار مورد استفاده قرار گرفت.

**تست های بیوشیمیایی:** از نمونه ابتدا اسمیر تهیه گردید و با استفاده از روش رنگ آمیزی اسیدفست (زیل نلسون) مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفتند (۱). کلیه نمونه ها پس از آلودگی زدایی به روی محیط کشت لوین اشتاین جانسن (Lowen stein-Jensen) کشت داده شدند و در دمای ۳۷°C انکوبه گردیدند. از کلنی های رشد یافته به روی محیط کشت، پس از ۱۲-۱۰ روز جهت تست های بیوشیمیایی تفکیکی شامل بررسی تولید نیاسین (Niacin) در محیط کشت، احیاء نترات (Nitrate) و کاتالاز (Catalase) (در دمای اتاق و در دمای ۶۸°C) استفاده گردید (۱).

**استخراج DNA ژنومی:** حداقل دو کلنی از هر سویه برای استخراج DNA به روش جوشاندن ساده مورد استفاده قرار گرفت (۸). نمونه های استخراج شده توسط اسپکتروفتومتر دارای طول موج UV (Shimatzo)، آلمان) از لحاظ خلوص DNA استخراج شده در دو طول

موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر مورد سنجش قرار گرفتند. **PCR:** توالی به طول ۴۳۹bp از ژن *hsp65* توسط دو پرایمر اختصاصی جنس *Tb11.5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT* و *Tb12 5'-CTTGTGCAACCGCATACCT* از سویه های کلینیکی جدا شده تکثیر شد (۸). برای انجام PCR از کیت Set system (سیناژن - ایران) استفاده گردید. ترکیب PCR mix به حجم ۵۰μl برای هر واکنش از KCl با غلظت ۵۰Mm، Tris-HCl با غلظت ۱۰Mm، هر داکسی ریبونوکلئوتید تری فسفات (pH:۸/۴)، هر داکسی ریبونوکلئوتید تری فسفات ۲۰۰μM، MgCl2 با غلظت ۱/۵mM، ۰/۵μM از هر پرایمر، ۱/۲۵ واحد از آنزیم Taq-DNA Polymerase، ۲۰۰-۷۵ نانوگرم از DNA ژنومی هر سویه جدا شده و ۲۸/۱μl آب مقطر استریل دیونیزه استفاده شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Techgene، انگلستان) به شرح زیر انجام شد: ۵ دقیقه در حرارت ۹۵°C سپس ۴۵ سیکل حرارتی شامل ۹۴°C یک دقیقه، ۶۰°C یک دقیقه، ۷۲°C یک دقیقه و در نهایت یک سیکل حرارتی ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه. از ژنوم باکتری اشریشیا کلی که به روش جوشاندن استخراج شده بود نیز به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. بعد از انجام واکنش PCR، ۵μl از نمونه های PCR شده در ژل آگاروز ۱ درصد حاوی اتیدیوم بروماید در کنار مارکر  $\phi$ X 174 (فرمنتاز - کانادا) با ولتاژ ۹۰ ولت الکتروفورز گردیدند. حضور باند قوی در منطقه ۴۵۰-۴۲۰bp این مارکر مؤید تکثیر شدن قطعه مورد بررسی بود.

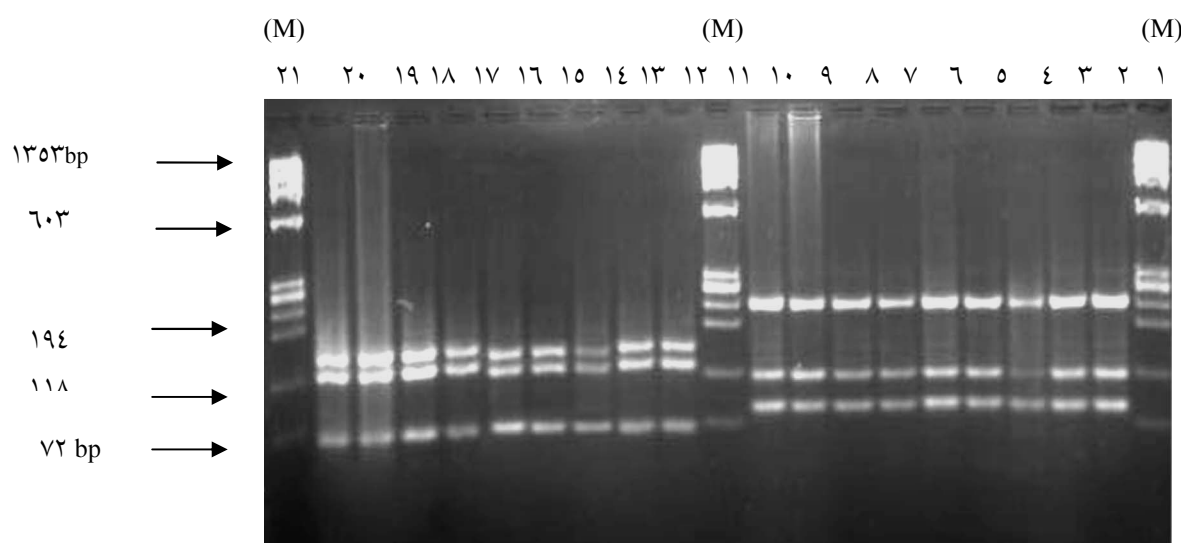
**هضم اندونوکلئازی:** از دو آنزیم محدودالانتر *HaeIII* و *BstEII* (فرمنتاز - کانادا) برای هضم آنزیمی محصول PCR استفاده گردید (۸). برای هضم آنزیمی *HaeIII*، ۱۰μl از محصول PCR، ۵ واحد آنزیم و بافر مخصوص آنزیم اضافه شد و در دمای ۳۷°C به مدت ۲ ساعت انکوبه گردید. برای هضم آنزیمی *BstEII* نیز ۱۰μl از محصول PCR به ۵ واحد آنزیم

و بافر مخصوص آنزیم اضافه شد (۸). بعد از اتمام زمان فوق به هر لوله ۱۰۰ μl از EDTA با غلظت ۰/۵M به عنوان متوقف کننده فعالیت دو آنزیم اضافه شد. نمونه‌های هضم شده در کنار مارکر φX 174 در ژل آگاروز ۲ درصد حاوی اتیدیوم پروماید با ولتاژ ۱۰۰ ولت الکتروفورز شدند. ژل آگاروز تهیه شده در این مرحله وارد ژل داکومنتیشن (Vilber Lormant، آلمان) می‌شد و از آن عکسبرداری می‌گردید.

### یافته‌ها:

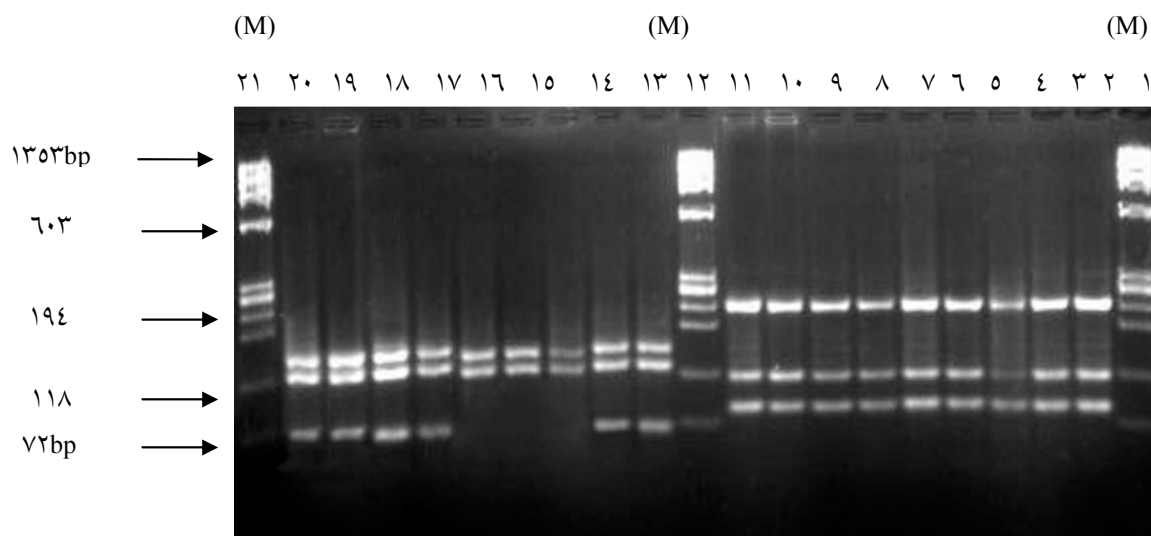
۱۵۰ سویه کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بر اساس کند رشد بودن، اسید فست بودن و مثبت بودن تست‌های بیوشیمیایی چون نیاسین، نیترات و

کاتالاز در دمای اتاق و همچنین منفی بودن کاتالاز در دمای ۶۸°C جدا سازی و تعیین هویت شدند (۱) تمامی این سویه‌ها در الکتروفورز اولیه بعد از انجام واکنش PCR دارای میزان کافی از توالی هدف تکثیر شده بودند. در هضم آنزیمی ۱۴۵ سویه کلینیکی جدا شده با ۳ سویه استاندارد مورد استفاده، دارای الگوهای یکسان، مشخص و کاملاً شبیه به همدیگر بودند از ژنوم باکتری BCG برای کنترل نمودن پرایمرهای اختصاصی جنس استفاده گردید (تصویر شماره ۱). این سویه‌ها در هضم آنزیم *BstEII* در کنار مارکر دارای سه باند قوی با اندازه‌های ۲۵۰/۱۲۰/۸۲bp بودند. همچنین همه سویه‌های فوق در هضم آنزیمی *HaeIII* دارای سه باند به طول‌های ۱۶۵/۱۴۰/۷۲bp بودند. حضور باندهایی با طول کمتر از ۶۰bp به عنوان پرایمر دایمر



**تصویر شماره ۱:** الگوهای یکسان بدست آمده، حاصل از هضم اندونوکلازای محصول PCR توالی ۴۳۹bp از ژن *hsp65* مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با آنزیم‌های *HaeIII* و *BstEII* به روی ژل آگاروز ۲ درصد. شماره ۱، ۱۱، ۲۱ (M) مربوط به مارکر است (۱۳۵۳-۷۲bp). شماره‌های ۱۰-۲۰ توسط آنزیم *BstEII* هضم شده‌اند که شماره ۲ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه H37Rv، شماره ۳ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه BKH37، شماره ۴ مایکوباکتریوم بوویس (BCG) و شماره‌های ۵-۱۰ سویه‌های کلینیکی می‌باشند. همچنین شماره‌های ۱۲-۲۰ توسط آنزیم *HaeIII* هضم شده‌اند که شماره ۱۲ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه H37Rv، شماره ۱۳ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه BKH37، شماره ۱۴ مایکوباکتریوم بوویس (BCG) و شماره‌های ۱۵-۲۰ سویه‌های کلینیکی می‌باشند.





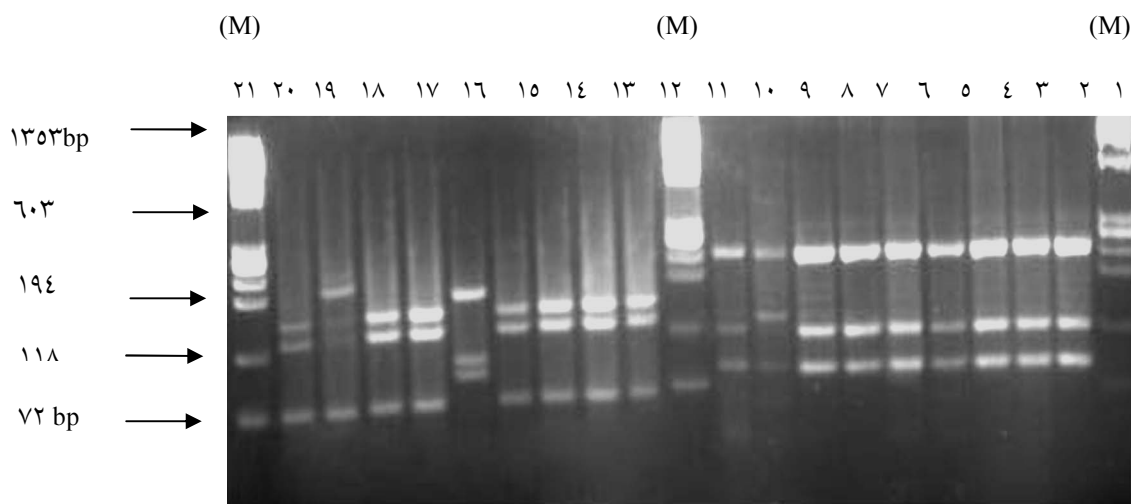
**تصویر شماره ۲:** الگوهای غیریکسان بدست آمده، حاصل از هضم اندونوکلازای محصول PCR ۴۳۹bp از ژن *hsp65* مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با آنزیم‌های *HaeIII* و *BstEII* به روی ژل آگاروز ۲ درصد. شماره ۱، ۱۱، ۲۱ (M) مربوط به مارکر است (۱۳۵۳-۷۲bp). شماره‌های ۱۰-۲ توسط آنزیم *BstEII* هضم شده‌اند که شماره ۲ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه H37RV شماره ۳ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه BKH37 و شماره‌های ۱۰-۴ سویه‌های کلینیکی می‌باشند. همچنین شماره‌های ۱۲-۲۰ توسط آنزیم *HaeIII* هضم شده‌اند که شماره ۱۲ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه H37RV، شماره ۱۳ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه BKH37 و شماره‌های ۱۴-۲۰ سویه‌های کلینیکی می‌باشند. سویه‌های ۱۴، ۱۵، ۱۶ سویه‌های کلینیکی می‌باشند که فاقد توالی ۷۰bp در هضم *HaeIII* خود می‌باشند. این سه سویه (به ترتیب شماره‌های ۴، ۵، ۶) در هضم *BstEII* خود دارای الگوی یکسان با بقیه سویه‌ها می‌باشند.

*hsp65* مایکوباکتریومی یکی از تکنیک‌های مناسب در تایپینگ سریع انواع مایکوباکتریوم‌ها تا سطح گونه در آزمایشگاه‌های رفرانس مایکوباکتریولوژی است (۱۳-۸). با این حال در تعدادی از گونه‌های مایکوباکتریومی توسط این تکنیک بیش از یک الگوی خاص مشاهده شده است (۱۳-۸). با مشخص شدن سوابق تایپ‌هایی در تعدادی از گونه‌های غیر توبرکلوزی مانند اسکروفولاسئوم (۶)، گوردونه، چلونه ای و کانزاسی (۱) محققان، استفاده از این تکنیک را برای دنبال کردن اپیدمیولوژی مولکولی این گونه‌ها توصیه نموده‌اند. با توجه به مطالعات انجام شده پلی‌مورفیسم مشخصی در الگوهای حاصل از هضم آنزیمی محصول PCR این ژن در کمپلکس

(Primer dimmer) در نظر گرفته شد. ۵ سویه کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جدا شده، در الگوهای بدست آمده از هضم *HaeIII* خود دارای تفاوت‌های الگویی با بقیه بودند. سه سویه فاقد فراگمنت ۷۰bp (تصویر شماره ۲) و یک سویه جدا شده دارای سه فراگمنت به طول‌های ۱۸۰/۱۰۰/۸۰ و یک سویه دارای دو فراگمنت به طول‌های ۱۹۴/۷۲ بودند (تصویر شماره ۳). ۵ سویه کلینیکی فوق مجدداً توسط کیت PCR تشخیص مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مورد تأیید قرار گرفتند.

## بحث:

روش PCR-RFLP بر اساس توالی ۴۳۹bp از ژن



**تصویر شماره ۳:** الگوهای غیریکسان بدست آمده، حاصل از هضم اندونوکلازای محصول PCR ۴۳۹bp از ژن *hsp65* مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با آنزیم های *HaeIII* و *BstEII* به روی ژل آگاروز ۲ درصد. شماره ۱، ۱۱، ۲۱ (M) مربوط به مارکراست (۱۳۵۳-۷۲bp). شماره های ۱۰-۲ توسط آنزیم *BstEII* هضم شده اند که شماره ۲ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه H37Rv، شماره ۳ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه BKH37 و شماره های ۱۰-۴ سویه های کلینیکی می باشند. همچنین شماره های ۲۰ توسط آنزیم *HaeIII* هضم شده اند که شماره ۱۲ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه H37Rv، شماره ۱۳ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه BKH37 و شماره های ۲۰-۱۴ سویه های کلینیکی می باشند. سویه های ۱۶، ۱۹ سویه های کلینیکی می باشند که در هضم *HaeIII* خود دارای الگوی متفاوت می باشند. این دو سویه (به ترتیب شماره های ۶، ۹) در هضم *BstEII* خود دارای الگوی یکسان با بقیه سویه ها می باشند.

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس شناسایی نشده است (۸، ۱۰-۱۳). الگوی باندهای ایجاد شده پس از هضم آنزیمی در ۱۴۵ سویه کلینیکی ثابت بود و با یافته های Telenti و همکاران وی مطابقت داشت. Taylor و همکاران در سال ۱۹۹۷ استفاده از تکنیک فوق را برای استفاده روتین تشخیص مایکوباکتریوم های رشد کرده در محیط مایع توصیه نمودند. در این مطالعه اشاره شده است که مایکوباکتریوم توبرکلوزیس دارای الگوی ثابت هضم آنزیمی است (۱۴). نتایج مطالعه وی با نتایج مطالعه حاضر در ۱۴۵ سویه کلینیکی مطابقت دارد ولی در این مطالعه ۳ الگوی متفاوت و غیرقابل انطباق با هم در هضم محصول PCR با آنزیم *HaeIII* مشاهده گردید. همچنین در مطالعات انجام شده توسط DaRocha و همکاران وی (۱۱) و همچنین Hafner

همکارانش (۱۳) اشاره شده است که مایکوباکتریوم توبرکلوزیس دارای الگوی ثابت و مشخص است ولی در موارد نادر در سویه های کلینیکی ممکن است مواردی از پلی مورفیسم (۳) پلی مورفیسم متفاوت در این مطالعه مشاهده گردد. نتایج دو مطالعه فوق نیز با نتایج بدست آمده در ۱۴۵ سویه کلینیکی از تعداد ۱۵۰ سویه منطبق می باشد.

سه سویه دارای الگوی هضمی مشابه با هم بودند (هر سه فاقد باند ۷۰ bp در هضم *HaeIII*) که از زندان جدا شده بودند. وجود تطابق الگو هضمی حاکی از منشاء مشترک بیمارانی بود که این سه سویه از آنها جدا سازی شدند. وجود ۳ الگوی متفاوت بدست آمده از هضم آنزیمی *HaeIII* از طریق وجود موتاسیون های نقطه ای در توالی هدف این آنزیم



توجیه پذیر است (۱۶،۱۵). این یافته ها ثابت می کند که ممکن است در توالی این ژن در گونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در سویه های کلینیکی در موارد نادری تفاوت هایی موجود باشد. در مطالعه تکمیلی دیگر که باید از سویه های کلینیکی تمام نقاط کشور استفاده شود نتیجه این مطالعه می تواند کمک کننده باشد همچنین پیشنهاد می شود که علاوه بر بررسی تکمیلی سویه های کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تمام نقاط کشور این روش در مورد گونه های غیر توبرکلوزی نیز بررسی گردد. تکنیک PCR-RFLP بر اساس توالی ژن *hsp65* قادر نیست که سویه های مختلف مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را از هم افتراق دهد و لذا نمی تواند کاربردی در تایپینگ سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مانند روش هایی چون استفاده از PCR-RFLP بر اساس توالی IS 6110 و یا Spoligo typing داشته باشد. اگرچه تایپینگ بر اساس IS 6110 به عنوان Gold standard پذیرفته شده است (۱) ولی در سویه هایی که دارای تعداد کمی پائین از توالی IS 6110 یا فاقد این توالی اند Spoligo typing بسیار کمک کننده است (۱۷). همچنین بر طبق منابع موجود استفاده از Sequencing توالی ۴۳۹bp از ژن *hsp65* بسیار قابل اعتماد در افتراق گونه های مایکوباکتریومی از همدیگر است و به راحتی می تواند پلی مورفیسم های درون گونه ای را نیز شناسایی کند (۱).

### نتیجه گیری :

به طور کلی نتایج این مطالعه حاکی از ثابت و یکسان بودن الگوهای بدست آمده از هضم محصول

PCR ژن *hsp65* ۱۰۰ درصد با آنزیم *BsteII* و ۹۷ درصد با آنزیم *HaeIII* در سویه های کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس داشت. نتایج فوق نشان داد که اگرچه تکنیک PCR-RFLP بر اساس ژن *hsp65* در تایپینگ سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ارزش چندانی ندارد ولی در موارد نادری، در سویه های کلینیکی ممکن است پلی مورفیسم هایی (۵ سویه با سه الگوی متفاوت) نیز مشاهده گردند که چنانچه در مقیاس بسیار وسیع تر این تکنیک بکار رود ممکن است همچون تعدادی از مایکوباکتریوم های غیر توبرکلوزی الگوهای خاص اپیدمیولوژیک بدست آید (۸،۱۱) با این وجود تکنیک PCR-RFLP بر اساس ژن *hsp65* می تواند به عنوان یک تکنیک معمول و قابل انجام در تمام آزمایشگاه های رفرانس کشور و یا حداقل در تعدادی از این آزمایشگاه ها برای تعیین هویت سریع تعداد زیادی نمونه مایکوباکتریومی جدا شده از لحاظ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، به کار رود. لذا توصیه می شود که در آزمایشگاه های رفرانس برای تأیید سویه ها در مقیاس زیاد از این روش استفاده گردد.

### تشکر و قدردانی :

با تشکر و قدردانی از تمامی اعضاء هیئت علمی گروه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه جندی شاپور اهواز و تشکر خاص از جناب آقای دکتر ضیغمی، آقای دکتر منفرد و آقای دکتر فرخ نیا و همچنین تشکر از کارشناسان محترم مرکز رفرانس سل و جذام اهواز آقای فریدون کمایی و خانم ها منیژه اسکندری و حمیرا عسکری که در این طرح نهایت همکاری را با ما لحاظ نمودند.

### References:

1. Murray PR, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover MC. Manual of clinical microbiology. 8<sup>th</sup> ed. Washington D.C: ASM Press. 2003; p: 532-60.

2. Butler WR, Jost KC, Kilburn JO. Identification of mycobacteria by high performance liquid chromatography. J Clin Microbiol. 1991; 29: 2468-72.
3. Musial C, Tice L, Stockman L, Robert G. Identification of mycobacteria from culture by using the Gen-Prob, rapid diagnostic system for *mycobacterium avium* complex and *mycobacterium tuberculosis* complex. J Clin Microbiol. 1988; 26: 2120-3.
4. Soini H, Bottger CE, Viljanen MK. Identification of mycobacteria by PCR based sequence determination of the 32-Kilodalton protein gene. J Clin Microbiol. 1994; 32: 2944-7.
5. Takewaki SI, Okuzumi K, Manabe I, Tanimura M, Miyamurak T. Nucleotide sequence comparison of the *mycobacterial dnaJ* gene and PCR-restriction length polymorphism analysis for identification of *mycobacterial species*. Int J Syst Bacteriol. 1994; 44: 159-66.
6. Zolg JW, Philippi-Schulz S. The superoxide dismutase gene, a target for detection and identification of *mycobacteria* by PCR. J Clin Microbiol. 1994; 32: 2801-12.
7. Kim BJ, Lee SH, Lyu MA, Kim SJ, Bai GH, Chae GT, et al. Identification of *mycobacterial species* by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (rpoB). J Clin Microbiol. 1999; 37: 1714-20.
8. Telenti A, Marches F, Balz M, Bally F, Bottger E, Bodmer T. Rapid identification of *mycobacteria* to species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. J Clin Microbiol. 1993; 31(2): 175-8.
9. Shinnick TM. The 65-Kilodalton antigen of *mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol. 1987; 169(3): 1080-8.
10. Khosravi AD, Stanford JL, Donoghue HD, Rook GA. Variation within *mycobacterim scrofulaceum*. J Appl Microbiol. 1997; 83: 596-602.
11. Da Rocha AS, Werneck Barreto AM, Compos CED, da Silva MVB, Fonseca L, Suffys PN. Novell allelic variants of *mycobacteria isolated* in Brazil as determined by PCR-restriction enzyme analysis of *hsp65*. J Clin Microbiol. 2002; 40(11): 4169-91.
12. Brunello F, Ligozzi M, Cristelli E, Bonora S, Tortoli E, Fontana R. Identification of 54 *mycobacterial species* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. J Clin Microbiol. 2002; 39(8): 2799-806.
13. Hafner B, Haag H, Geiss HK, Nolte O. Diffrente molecular methods for the identification of rarely isolated non-tuberculous mycobacteria and description of new *hsp65* restriction fragment length polymorphism patterns. Mol Cell Probes. 2004; 18: 59-65.
14. Taylor.TB, Patterson.C, Hale.Y, Safranek.WW,. Routine use of PCR-restriction length polymorphism analysis for identification of mycobacteria growing in liquid media. J Clin Microbiol. 1997; 35: 79-85.
15. Mizrahi V, Andersen SJ,. DNA repair in *mycobacterium tuberculosis*: what have we learnt from the genome sequence? Mol Microbiol. 2004; 29(6): 1331-9.
16. Sreevatsan S, Pan X, Stockbaure KE, Connell ND, Kerswirth BN, Wittam TS, etal,. Restricted structural gene polymorphism in the *mycobacterium tuberclulosis* Complex indicates evolutionarily recent global dissemination. Proc Natl Acad Sci. 2004; 94: 9869-74.
17. Goyal M, Saunders AN, Van Embden AD, Shaw JR. Differentiation of mycobacterium tuberculosis isolated by spoligotyping and IS 6110 restriction fragment length polymorphism. J Clin Microbiol. 1997; 35(3): 647-51.

